



Detectie van cortisol in haren of wol - het belang van de toegepaste wasmethode

Elly C. Zeinstra¹, Mireille Bentvelzen¹, Hans Vernooij¹,
Rebecca E. Nordquist¹ en F. Josef van der Staay¹

*¹Gedrag & Welzijn Groep, Departement Populatie Gezondheidswetenschappen, Afdeling Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht
Contactpersoon: Elly Zeinstra, e.c.zeinstra@uu.nl.*

Dierenwelzijn krijgt niet alleen meer aandacht in Europa, maar staat wereldwijd in de belangstelling. Een mogelijke verklaring voor de toenemende bezorgdheid over dierenwelzijn is dat steeds meer mensen gaan erkennen dat dieren bewuste wezens zijn [1]. Deze verandering in houding tegenover dieren is waarschijnlijk te danken aan de verschillende studies en rapporten over dierenwelzijn en de cognitieve capaciteiten (het vermogen om informatie op te nemen en te verwerken) van dieren [1].

Dieren kunnen stress ervaren. Wanneer een situatie stressvol is, wordt het brein geactiveerd om zich aan te passen aan een stressor. Een stressor kan de homeostase, zelfregulering van het lichaam waardoor het interne evenwicht gehandhaafd wordt, van het dier uit balans brengen [2]. Via de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as (HPA-as: hypothalamic-pituitary-adrenal axis), een centraal stressreactiesysteem waarbij een samenwerking tussen het zenuw- en hormoonstelsel plaatsvindt, wordt de afgifte van het stresshormoon cortisol geactiveerd. Cortisol speelt een belangrijke rol in het centrale zenuwstelsel en het immuunsysteem. De concentratie van cortisol in verschillende weefsels wordt gebruikt als indicator voor stress [3]. Cortisol kan worden gemeten in bloed en speeksel (acute stress), urine en feces (stressindicatie over resp. 24 uur en 10-12 uur) [3,4] en veren en haren (chronische stress) [4,5].

Cortisol in haren

Het gebruik van haarmonsters is niet-invasief en relatief nieuw. De cortisolconcentratie in het haar geeft een overzicht van de cortisolaccumulatie gedurende de tijd dat het haar is gegroeid [4,5]. Hoe cortisol zich ophoopt in het haar is nog niet volledig bekend. Genoemd worden een actieve of passieve diffusie via bloed, talg of zweet [4,6]. Verder vertonen haarzakjes een regulerend systeem, vergelijkbaar met de HPA-as, dat de cortisolconcentratie in de haarschacht beïnvloedt. Bovendien kunnen de omgeving, de locatie op het lichaam, de kleur van het haar, de leeftijd, het ras en type haar van het »

dier en de gezondheidstoestand van invloed zijn op de cortisolconcentratie [3,4].

Haarcortisol werd reeds gemeten in verschillende (dier)soorten, waaronder schapen [5,6], koeien [3], varkens, rhesusmakaken [4] en mensen [7].

Om betrouwbaar cortisol in haren of wol te kunnen meten moet worden uitgesloten dat cortisol in verontreinigingen (bijvoorbeeld cortisol uit ontlasting en/of urine in de vacht) de bepaling van de cortisolconcentratie beïnvloedt. Schapenwol is vaak sterk verontreinigd (bijvoorbeeld door vuil, vet en/of residuen van plantenmateriaal [8]). Daarom is het nodig elke verontreiniging, maar in het bijzonder cortisolverontreiniging van buiten de haarschacht te verwijderen, zonder de interne cortisol van de haarschacht te verliezen. Betrouwbaar gemeten cortisolconcentraties in wol zouden kunnen dienen als een lange-termijn indicator voor de stress die het schaap heeft ondergaan en daarmee als indicator voor het dierenwelzijn. Een betrouwbare, sensitieve en herhaalbare methode, waarbij een accurate cortisolwaarde met minimale spreiding gemeten kon worden was hiervoor een vereiste.

We hebben de cortisolbepaling volgens de gebruikelijke wolbewerking [4] toegepast in een groot opgezette gedragsstudie met ooiën van verschillende pariteit (primipaar - eerste maal werpen - tegen multipaar) en verschillende worpgrootte (aantal lammeren). De verwachting was dat pariteit en aantal lammeren een verschil in chronische stress zou kunnen veroorzaken welke te meten zou moeten zijn via de cortisolwaarden in de wol. Uit deze studie, na aanpassing van de wasmethode, bleek dat zowel de pariteit als de worpgrootte en het gedrag geen invloed hadden op de cortisolwaarden in de wol van de ooiën en de lammeren.

De cortisolresultaten, met name de enorme spreiding van waarden van het bovengenoemde experiment, gaven aanleiding tot herhaling bij 38 schapen (14 ooiën en 24 lammeren) waarbij de wolbewerking opnieuw werd toegepast. De vraag was of de extra wolbewerking vergelijkbare resultaten zou geven als bij de eerste meting. De opnieuw toegepaste wolbewerking leek een aantal metingen nogal te beïnvloeden (Afb. 3). Wij vermoedden dat de graad van vervuiling van de wol, en dus de efficiëntie van de toegepaste wolwasmethode, een oorzaak voor de enorme spreiding in de oorspronkelijke metingen was. Om dit vermoeden verder te onderzoeken hebben we vervolgens uit het bovengenoemde experiment drie ooiën geselecteerd voor het testen en vergelijken van verschillende wolwasmethoden (Tabel 1) op de hoogte en spreiding van de cortisolmetingen.



Afbeelding 1. De drie, elkaar opvolgende fasen van de studie, en het aantal ingezette schapen (ooiën en lammeren).

Box 1. Details en productnamen behorend bij de materiaal en methoden.

- Wet op dierproeven: de Wet op de Nederlandse experimenten op dieren van 18 december 2014, § 1 artikel 1, 1b, 13a)
- Voer: Concentraatkorrels voor schapen en lammeren (De Heus, 32 kg 4061 (schapen/ amconcentraat) toegevoegd aan 300 kg 5415 (pulp:gedroogde en geperste bietenschil)
- Liksteen: groene mineralen en zout, Brokking/de Heus
- Wegwerpscheermesje: Disposable Prep Razor, Kai medical, AUV Veterinary Services,
- Servoprax GmbH Germany
- 89% isopropanol: EMSURE, VWR Internatiol B.V. Nederland
- Stoof: Memmert, Depex nv de Bilt/Holland
- Tissuelyser II: QIAGEN, Benelux B.V. Nederland
- Beads 3,2 mm: QIAGEN, BiosSpec Products Lab Services B.V. Nederland
- Centrifuge: Mikrostar 17R.VWR
- Methanol: EMSURE, VWR International BV Nederland
- Soniceren: Sonicor Instrument Corporation, Copiague NY
- Speedvac: Savant, automatische omgeving Speedvac, AES 1000
- Cortisol ELISA kit: Salimetrics High Sensitivity Salivary Cortisol ELISA kit 1-3002 USA
- Multimode Detector: DTX 880, Beckman Coulter, Inc.

Materiaal en methoden

Details en productnamen zijn opgenomen in Box 1.

Voor deze studie is wol van oaien gebruikt, dat op een niet-invasieve, pijnvrije manier werd verzameld. Hierdoor was voor dit onderzoek geen Projectvergunning van de CCD nodig ('Wet op de dierproeven'). Deze studie is echter geregistreerd en het studieprotocol is geëvalueerd door de Instantie voor Dierenwelzijn van de Universiteit Utrecht.

Dieren: het onderzoek, bestaande uit drie opeenvolgende fasen, werd uitgevoerd met oaien en lammeren van de boerderij van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. Deze kudde schapen (*Ovis aries*) van het Swifter-ras (voor meer informatie zie de website 'swifter.be' vermeld onder de bronnenlijst aan het einde van dit artikel) wordt voornamelijk gehouden voor de vleesproductie. De oaien in dit onderzoek hadden één tot vier lammeren.

De opzet van deze studie is schematisch in Afbeelding 1 weergegeven. In deze publicatie worden data uit de tweede en derde fase in detail besproken. Voor de oorspronkelijke, groot opgezette studie (fase 1) werd cortisol in de wol van 387 schapen bepaald. In een herhalingsonderzoek (fase 2) werd de wol van een steekproef van 38 schapen (14 oaien met de bijbehorende 24 lammeren) uit het oorspronkelijke onderzoek gebruikt. In de derde fase werden de effecten van de wolwasmethoden op de cortisolmetingen en de spreiding van deze metingen in wolmonsters, genomen van drie witharige oaien uit de kudde, bepaald.

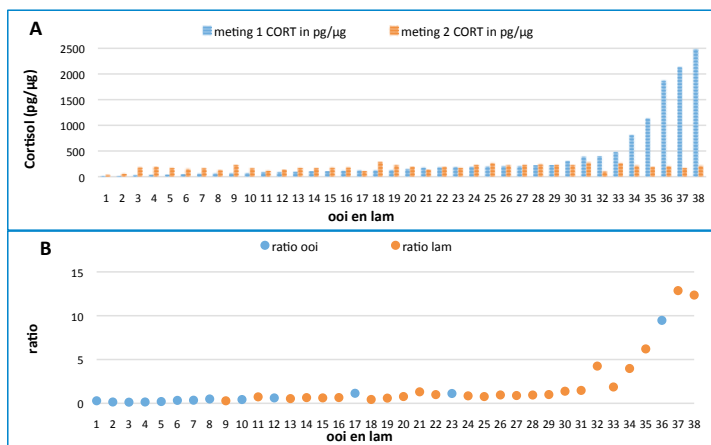
Huisvesting: gedurende het jaar werd de kudde op grasland gehouden. Tijdens het lammerseizoen werden de oaien in groepen van 50 in hokken ter grootte van 85 m² op strobedding gehuisvest. Na het lammeren

Afbeelding 2. Het scheren van een van de oaien, caudomediaal.



»

Afbeelding 3. Herhalen van het experiment (fase 2) met de oude methode (Davenport). A. De x-as toont de 38 schapen (14 ooiën en 24 lammeren), de y-as geeft de cortisolwaarden van de twee metingen weer in pg/μg haar. B. De x-as toont de individuele 38 schapen en de y-as geeft de ratio van de cortisolconcentratie van de meting uit fase 1 gedeeld door meting uit fase 2 weer. Gesorteerd is op meting 1 van klein naar groot.



werden de ooi en haar lammeren een tweetal dagen in individuele hokken (2-4 m²) gehouden. Hierna waren de lammeren sterk genoeg en werden zij met hun moeders in groepen teruggeplaatst (variërend in groepsgrootte van 10 tot 35 ooiën met hun lammeren) in hokken ter grootte van 60 m² tot 95 m².

Water en kuilgras waren ad libitum beschikbaar. Daarnaast kregen alle schapen twee keer per dag voer, per ooi per dag gemiddeld 666 g. Na twee weken werd een voederdoos met concentraatpellets in de pen geplaatst die enkel beschikbaar was (ad libitum) voor lammeren. Verder hadden alle dieren toegang tot een liksteen. Elke ooi had een halsbandnummer en een oormerk voor identificatie. Voordat de lammeren terug in de kudde werden geplaatst kregen ze een oormerk.

Tabel 1. Beschrijving van de toegepaste wasmethoden.

Methode	Korte beschrijving
1	Aan het monster werd 20 ml demi-water toegevoegd en gedurende 3 minuten op de rollerbank geplaatst bij 30 RPM. Na afgieten werd vervolgens 20 ml 80% isopropanol toegevoegd, en werd het monster opnieuw 3 minuten bij 30 RPM op de rollerbank geplaatst. Na afgieten werd het monster gedroogd bij 37 °C. (De methode Davenport, opnieuw meegenomen).
2	Aan het monster werd 5 ml dichloormethaan toegevoegd en na 3 minuten op de rollerbank afgegoten en gedroogd bij 37 °C.
3	Een oplossing van 20 ml demi-water met 0,64 g natriumbicarbonaat (soda) werd aan het monster toegevoegd en gedurende één uur in een waterbad van 85 °C geplaatst. Vervolgens werd 20 ml demi-water toegevoegd en werd gedurende 5 seconden met de hand geschud. Daarna werd de wateroplossing verwijderd en werd opnieuw 20 ml demi-water toegevoegd en 5 seconden handmatig geschud. Deze laatste stap werd twee keer herhaald. Na het afgieten werd de wol bij 37 °C gedroogd.
4	Een oplossing van 20 ml van een mengsel bereid met 200 ml demi-water en 20 g Biotex Green* (Unilever) werd toegevoegd aan het monster en gedurende één uur in een waterbad van 60 °C geplaatst. Vervolgens werd 20 ml demi-water toegevoegd en werd gedurende 5 seconden met de hand geschud. Daarna werd de wateroplossing verwijderd en werd 20 ml demi-water toegevoegd en gedurende 5 seconden met de hand geschud. Deze stap werd zes keer herhaald. Na het afgieten werd de wol bij 37 °C gedroogd.
5	Eerst werd de wol volgens de methode 2 gewassen, en daarna nog eens volgens methode 1.
6	Eerst werd de wol volgens de methode 3 gewassen, en daarna nog eens volgens methode 1.
7	Eerst werd de wol volgens de methode 4 gewassen, en daarna nog eens volgens methode 1.
8	Eerst werd de methode 4 uitgevoerd en vervolgens werd 20 ml 100% n-hexaan (J.T. Baker, VWR) toegevoegd waarna de monsters gedurende 3 minuten op een rollerbank bij 30 RPM werden geplaatst. Na het afgieten werd de wol bij 37 °C gedroogd.

*Biotex Green is een waspoeder dat wordt gebruikt voor materiaal dat niet in de wasmachine kan worden gereinigd. Het bevat enzymen die vlekken afbreken die bestaan uit vet, eiwitten of zetmeel.

Verzamelen van wolmonsters: vier weken voor het lammeren werden alle oeien geschoren. Binnen 48 uur na de dracht werd enkel flankwol, caudomediaal (Afb. 2), van de oeien en lammeren (gebruikt voor fase 1 en 2) over een klein oppervlak met behulp van een wegwerpscheermesje afgeschoren. Voor de derde fase werd aan het eind van de dracht, opnieuw flankwol, caudomediaal, afgeschoren. Deze laatste wol had een lengte van ongeveer 1 cm en groeide in de laatste maand van de dracht. De wolmonsters werden in acht gelijke porties verdeeld.

Alle verzamelde haarmonsters werden in het donker bewaard tot analyse, omdat onder invloed van UV-licht de cuticula-structuur (schubbenschicht) van haar/wol beschadigd wordt en daarmee cortisolverlies optreedt [9].

Wassen van de wolmonsters: voor het wassen zijn verschillende procedures beschreven. Davenport [4] beschreef een methode bij rhesusmakaken, deze methode is sindsdien bij vele diersoorten toegepast. Bij schapen werd een combinatie van methanol en isopropanol [5] en hexaan [6] gebruikt. Voor de eerste twee fasen van het onderzoek werden de wolmonsters volgens de Davenport-methode [4] gewassen. Voor de derde fase werden acht gelijke porties per schaap gewassen volgens een van acht verschillende methoden (Tabel 1). Na het wassen werden alle wolmonsters verder opgewerkt voor de cortisolbepaling. Aangezien de herhaalde cortisolmetingen, fase 2, van de 38 dieren (14 oeien en hun 24 lammeren) na de procedure Davenport (oude methode) een nogal variabele uitkomst gaven met grote spreiding 9 (Afb. 3) was de verwachting dat lanoline storend werkt.

Lanoline of wolvet is het vet dat voorkomt in de wol van schapen. Voor het verwijderen van de lanoline, vooral belangrijk vooraf aan het spinnen van Merinowol, worden meerdere methodes toegepast; soda en/of een wolwasmiddel ("draadjesenpraatjes"; zie website vermeld onder de literatuurlijst). Albanell et al. [10] die juist de lanoline gebruikten, hebben een tweetal methodes toegepast; water, zeep en natronloog of hexaan en water.

Wasmethode naar Davenport [4]: met deze wasmethode werden de wolmonsters van alle schapen uit fase 1 en 2 opgewerkt. De wolmonsters werden tweemaal met 80% isopropanol gewassen en vervolgens gedurende zeven dagen gedroogd bij 37 °C in een stoof. Indien de monsters na deze wasstap nog geen helder afvalwater hadden, werd de wol extra gewassen met demi-water en isopropanol en daarna gedroogd.

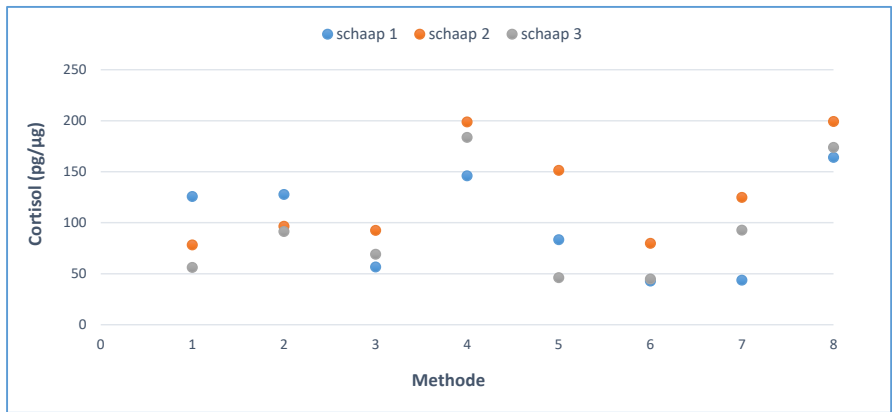
De verdere bewerking: na het wassen en drogen werd de wol in stukjes van <5 mm geknipt, 35 mg droge wol werd afgewogen in een 2,0 ml Eppendorfer-vaatje. Met behulp van een TissueLyser II werd de wol met drie beads van 3,2 mm verpulverd (15 min - 30 Hz). Daarna werden de monsters gecentrifugeerd, 15 min - 17000G. Deze twee stappen werden herhaald totdat al de wol in de vaatjes was verpulverd. Meestal was het twee keer herhalen van deze stappen voldoende.

Cortisolbepalingen: voor de cortisolextractie werd 1 ml methanol aan het verpulverde monster toegevoegd, de beads verwijderd en na 30 minuten blootstelling aan een hoge frequentie (soniceren), 24 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur onder voortdurende beweging. Na centrifugeren werd 0,6 ml van het supernatant (de bovendrijvende laag) gedurende ongeveer drie uur in een Speedvac ingedampt. Hieraan werd 200 µl buffer (PBS), uit de Salimetrics High Sensitivity Salivary Cortisol ELISA-kit toegevoegd. Vervolgens werden de monsters nog 24 uur op de Roller Bank geplaatst om een homogene oplossing van cortisol te krijgen. De ELISA werd uitgevoerd volgens de instructies van de leverancier. De monsters werden gemeten in een Multimode Detector.

Statistische analyses: de verschillen tussen de oorspronkelijke metingen (fase 1) en de herhaalde metingen (fase 2) bij 38 oeien en lammeren werden met behulp van R versie 3.6.0. geanalyseerd.

»

Afbeelding 4. Puntdiagram van de cortisolconcentratie (pg/μg haar) van acht verschillende wasmethoden bij drie schapen. Op de x-as zijn de wasmethoden (Tabel 1) aangegeven.



95% betrouwbaarheidsinterval

Wasmethode	Gemiddelde	Vershil	Ondergrens	Bovengrens
1	86.7	-	55.4	118.0
2	105.3	18.5	-19.5	56.6
3	72.8	-14.0	-52.0	24.1
4	176.1	89.4	51.4	127.5
5	93.6	6.9	-31.1	44.9
6	55.9	-30.9	-68.9	7.2
7	87.0	0.3	-37.7	38.4
8	179.1	92.4	54.3	130.4

Tabel 2. Gemiddelde cortisolconcentratie per wasmethode en berekend verschil met betrouwbaarheidsinterval tussen het gemiddelde van wasmethode 2 tot 8 met het gemiddelde van wasmethode 1 (voor details over de wasmethoden zie Tabel 1).

De verwachting was dat de cortisolconcentratie van de eerste en de tweede meting ongeveer gelijk zouden moeten zijn (Afb. 3). Anders gezegd: in 50% van de monsters verwacht je dat de eerste meting hoger is dan de tweede meting.

Effecten van de acht wolwasmethoden (fase 3) op de gemiddelde cortisolconcentraties werden in de wol van drie oaien met behulp van een Variantieanalyse (ANOVA, repeated measures) bepaald, omdat de acht wasmethoden bij elk van de drie schapen zijn uitgevoerd. Hierbij is het verschil tussen het gemiddelde van wasmethode 2 t/m 8 met het gemiddelde van wasmethode 1 berekend.

Resultaten

Cortisolmetingen: het verschil tussen de oorspronkelijke metingen (fase 1) en de nieuwe metingen bij de 38 oaien en lammeren (fase 2) was soms erg klein en soms enorm groot (Afb. 3). Dertien van de 38 dieren (34%; 95% betrouwbaarheidsinterval: 19,6% - 51,4%) hadden een hogere cortisolconcentratie in de eerste meting. Als we zo eenvoudig kijken (eerste meetwaarde is groter dan tweede meetwaarde) dan is de aanname - de herhaling van meting heeft geen structureel effect op de cortisolconcentratie - valide want 50% valt binnen het betrouwbaarheidsinterval.

Door de diversiteit van de uitslagen zijn we gaan twijfelen aan de wasstap volgens Davenport, is deze stap voldoende voor het reinigen van wol? Daarom hebben we verder onderzocht, of alternatieve wasmethoden sensitievere cortisolmetingen met kleinere spreidingen op zouden leveren.

De effecten van acht wolwasmethoden (fase 3, zie Afb. 4 en Tabel 2) op de cortisolconcentraties, in de wol van drie ooen, zijn in Afbeelding 4 weergegeven. Na wasmethode 4 en 8 werden hogere cortisolconcentraties gemeten en na wasmethode 2, 3, 6 en 8 was de variatie tussen de drie meetwaarden het kleinst.

De gemiddelde cortisolconcentratie van methode 4 en 8 bleken veel hoger dan het gemiddelde van methode 1 wat zich ook vertaalt in een groot verschil tussen de gemiddelden. Wasmethoden waarbij de waarde 0 (geen verschil tussen de gemiddelden) tussen de onder- en bovengrens van het betrouwbaarheidsinterval ligt zijn statistisch niet verschillend van het gemiddelde van wasmethode 1 (met name wasmethode 2, 3, 5, 6 en 7).

Discussie

In deze studie is onderzocht of cortisol in schapenwol meetbaar is en of dit in de toekomst kan bijdragen aan het meten van welzijn van schapen [5,6]. Daarbij werd in een steekproef (fase 2) uit de grotere studie (fase 1) onderzocht hoe replicerbaar de oorspronkelijk gevonden cortisolwaarden waren. De belangrijkste vraagstelling in dit manuscript was om verschillende wasmethoden te vergelijken om exogene cortisolbesmetting van de haarschacht te verwijderen, zonder de interne cortisol van de haarschacht te verliezen.

De gekozen acht methoden zijn tot stand gekomen via een combinatie van informatie van hobbyisten en commerciële instanties (zie websites "draadjesenpraatjes", "huisvlijt", "whnieuwenhuis", "wolvantexel", vermeld onder de literatuurlijst) en wetenschappelijke artikelen (4, 8–10). Elk type haar (wol) verlangt een andere methode voor het verwijderen van lanoline en van andere verontreinigingen.

Praktisch gezien was het vervilten van de wol een bijkomend probleem. Eenmaal vervilt, dan was er geen mogelijkheid meer tot verpulveren van de wol. Dit was afhankelijk van onder andere het temperatuurverschil tussen de verschillende wasstappen en de hoeveelheid wol die verpulverd werd (niet meer dan 50 mg). Bij de huidige test hebben we het opnieuw gegroeide wol, 1 cm lang, gebruikt. Naar aanleiding van onze bevindingen raden we aan om bij langer haar maximaal de direct boven de huid gelegen eerste 2 cm gebruiken, ter voorkoming van de invloed van beschadigd haar (wel gewicht maar minder/geen cortisol).

Het gebruikte ras, het Swifterschaap is in de jaren zeventig ontstaan en is een kruisingsproduct tussen De Texelaar, het Vlaams schaap en het Belgisch melkschaap (zie website "swifterras.be" vermeld onder de literatuurlijst). Swifters zijn rustige, vriendelijke schapen en zijn gemakkelijk te hanteren. Dit ras is naar verwachting niet erg stressgevoelig.

Conclusie

Wasmethode 4 en 8 leverden de hoogste cortisolwaarden op (Afb. 4), methode 8 gaf een kleinere spreiding. Methode 8 hebben we geselecteerd voor verdere analyses. Echter, verdere verfijning van deze methode op basis van Das en Ramaswamy [8] is wenselijk. Het verdient aanbeveling de effecten van de wasstappen op de hoogte en spreiding van cortisol uitvoerig te testen wanneer deze metingen in soorten worden toegepast waar nog weinig ervaring is met haar-cortisolbepalingen. Immers, de structuur van het haar, de aard en hoeveelheid van de verontreinigingen van de haarmonsters en de methode om deze verontreinigingen te verwijderen bepalen mede de betrouwbaarheid van de verkregen cortisolmetingen. De wasmethode die de meest sensitieve meting met de geringste spreiding oplevert, moet bij voorkeur worden toegepast.

Literatuur

1. Lawrence AB, Conington J (2008). Sheep welfare: a future perspective. In: Dwyer CM, editor. Springer Science+Business Media B.V.; p. 343–60. (The Welfare of Sheep).
2. De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. Nature >>

reviews Neuroscience 6: 463–75.

3. Burnett TA, Madureira AML, Silper BF, *et al.* (2014). Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* 97: 7685–7690.
4. Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK, *et al.* (2006). Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and comparative endocrinology* 147: 25–261.
5. Ghassemi Nejad J, Lohakare JD, Son JK, *et al.* (2014). Wool cortisol is a better indicator of stress than blood cortisol in ewes exposed to heat stress and water restriction. *Animal* 8(1): 128–132.
6. Stubbsj en SM, Bohlin J, Dahl E, *et al.* (2015). Assessment of chronic stress in sheep (part I): the use of cortisol and cortisone in hair as non-invasive biological markers. *Small*
7. D'Anna-Hernandez KL, Ross RG, Natvig CL, *et al.* (2011). Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic–pituitary axis activity throughout pregnancy: comparison to salivary cortisol. *Physiology & behavior* 104: 348–353.
8. Das T, Ramaswamy GN (2006). Enzyme treatment of wool and specialty hair fibers. *Textile research journal* Vol 6(2): 126–133.
9. Li J, Xie Q, Gao W, Xu Y, *et al.* (2012). Time course of cortisol loss in hair segments under immersion in hot water. *Clinica chimica acta* 413: 434–440.
10. Albanell CB, Carrer V, Marti M, *et al.* (2018). Solvent-extracted wool wax: thermotropic properties and skin efficacy. *Skin pharmacology and physiology* 31: 198–205.

Geraadpleegde websites

www.swifter.be/nl/swifterra.htm

<http://www.huisvlijt.com/2015/06/wat-is-het-verschil-tussen-baking-soda-en-soda.html>

<http://www.wolvantexel.nl/alles-wol/>

<http://whnieuwenhuis.blogspot.nl/2015/02/wol-ontvetten.html>

<http://draadjesenpraatjes.blogspot.com/2011/01/wolwas.html>

Meer referenties over dit onderwerp kunnen bij de auteur worden opgevraagd.

Titelfoto: Bas Niemans

«

